

氏 名 後 藤 大 也

学位(専攻分野の名称) 博 士 (畜産学)

学 位 記 番 号 乙 第 909 号

学 位 授 与 の 日 付 平成 28 年 2 月 20 日

学 位 論 文 題 目 ウシの加齢が卵子のミトコンドリアと受精能力に及ぼす影響

論 文 審 査 委 員 主査 教 授・博士(農学) 岩 田 尚 孝

教 授・博士(畜産学) 桑 山 岳 人

助 教・博士(農学) 白 砂 孔 明

非常勤講師・博士(農学) 橋 本 周

論文内容の要旨

哺乳類において、加齢に伴い卵の質が低下することは広く知られている。畜産では優良な家畜の長期利用、ヒトでは高齢期での妊娠などの観点から母体の加齢に伴う卵の変化やその対処方法を理解することは重要である。

本研究では、最初にウシ卵を用いて加齢が卵の質にどのような影響を与えるのかについて検討を行い、加齢に伴い卵の受精能、発生能が低下すること、若齢牛由来卵と老齢牛由来卵で発現に差が見られる遺伝子がミトコンドリア異常に関連付けられること、卵子の活性酸素含量が老齢牛由来卵で多くなることを示した。次に、卵のミトコンドリア DNA コピー数をリアルタイム PCR で測定し、老齢牛由来卵ではミトコンドリア DNA コピー数が減少することを明らかにした。さらに同一個体内では卵のミトコンドリア DNA 数が似通っていることを利用し、卵子の受精率やミトコンドリアの機能と DNA コピー数の間の関係性について調べた。その結果、若齢牛由来卵の受精率と ATP 含量との間に正の相関がみられるが、老齢牛由来卵では見られないこと、老齢牛由来卵では、ミトコンドリア数の減少が起きている反面、卵の異常受精率とミトコンドリア数との間に有意な正の相関がみられることを示した。最後に、老齢牛由来卵の特徴として、ヒストンのアセチル化について検討し、老齢牛由来卵ではヒストン H4K12 のアセチル化状態が M2 期卵で高く、この高アセチル化状態は老齢牛由来卵に多く含有されている活性酸素によって惹起されていること、抗酸化剤の添加によりこの高アセチル化状態が若齢と同程度に戻ることを示した。一方で高い異常受精率は抗酸化剤では回復しなかったが、ミトコンドリアの更新を促す効果があるレスベラトロールの添加処理では、老齢牛由来卵の受精率を有意に改善できることを明らかにした。

1). 母体の加齢が卵の質に与える影響

母体の加齢に伴う異常の概要を把握するために、加齢に伴う卵子の受精能と発生能の変化を検討し、また、加齢に伴い成熟卵の遺伝子発現がどのように変化するのかを網羅的に解析した。老齢牛由来卵では若齢牛由来卵に比べ正常受精率が減少し、異常受精が有意に増加した。また、老齢牛卵由来の胚盤胞では老齢牛由来卵の胚盤胞に比べ、その細胞数が有意に減少していることが観察された。さらに、遺伝子の網羅的発現解析では、若齢牛由来卵と老齢牛由来卵で変化する遺伝子の多くが、酸化的リン酸化反応やミトコンドリア機能障害に関連付けられた。そして、老齢牛由来卵では活性酸素の量が有意に増加していた。このことから老齢牛由来卵ではミトコンドリアに異常が起きていることが考えられたため、次の実験では、ミトコンドリアの数と機能が加齢ウシに特徴的に異常が認められた受精率とどのような関係にあるのかについて検討した。

2). 母体の加齢が卵のミトコンドリアに与える影響

卵に含まれるミトコンドリア DNA コピー数、ATP 量とドナー月齢との関係について検討した結果、個体の加齢に伴い卵に内包されるミトコンドリア DNA コピー数が減少することが観察された。また、同一の個体から卵を大量に採取するとその中の個性が似通っていることを利用し、採取した卵を 2 群に分け、それぞれのパラメーター間の相関を比較した。卵子の含有する ATP 量に関しては、老齢牛由来卵において異常に高い ATP を含有するものが多いことが分かった。またミトコンドリア DNA コピー数と ATP 量の相関を調べたところ、これらの要因間には相関が観察されず、卵子の ATP 量はミトコンドリア DNA コピー数が直接関与しているわけではないことが明らかになった。ATP 量と受精率の

関係では、若齢牛由来卵において ATP 量と正常受精に正の相関があったが、老齢牛由来卵では ATP 量と受精能の間には相関は観察されなかった。ミトコンドリア DNA コピー数と受精率との間の相関を検討したところ、異常受精率とミトコンドリア DNA コピー数との間に正の相関が観察され、一方で若齢牛由来卵では、このような相関は観察されなかった。これらのことからウシでは個体の加齢に伴いミトコンドリア DNA コピー数が減少し、機能的にも異常が起きていることが推測された。また卵子の受精能力は加齢に伴い低下することを明らかにした。

これらの結果より、加齢個体では異常ミトコンドリアを減少させるメカニズムがあり、それが破綻している個体では異常受精が高頻度に行っているのではないかと推測された。次章ではミトコンドリア異常により卵子の活性酸素含量が多いことや、活性酸素やエネルギー状態が細胞のヒストンアセチル化に影響することが知られているため、卵子中の加齢に伴うヒストンのアセチル化について検討した。

3). 母体の加齢がヒストンのアセチル化状態に与える影響

母体の加齢がヒストンのアセチル化状態に与える影響について検討した。さらに、ミトコンドリアの機能低下に起因すると考えられる活性酸素の除去とヒストンアセチル化の関係および体外受精との関係について検討し

た。結果として、老齢、若齢牛由来卵共に卵成熟中にアセチル化状態が有意に低下することが観察された。一方で、老齢牛由来卵では、若齢牛由来卵に比べて GV 期で H4K12 のアセチル化状態が有意に低く、逆に M2 期で高いことが明らかになった。次に老齢牛由来卵の体外成熟培地に対し、抗酸化剤である N アセチルシステイン (NAC) を添加したところ、成熟卵の活性酸素量が有意に減少し、ヒストンアセチル化状態も有意に減少したため、老齢牛由来成熟卵の高アセチル化状態は活性酸素に由来すると考えられた。一方で、成熟培地への NAC の添加は老齢牛由来卵の異常受精率には影響しなかった。しかし、ミトコンドリアの合成や分解を伴う更新を促す作用が報告されているレスベラトロールの卵成熟培地への添加効果を検討したところ、活性酸素の有意な除去効果は認められなかったにもかかわらず、老齢牛由来卵の高い異常受精率を有意に改善することが分かった。

これらの結果より母体の加齢に伴うミトコンドリアの異常や活性酸素の増加は、ヒストンのアセチル化状態に影響し、抗酸化剤の成熟培地への添加は成熟卵子のヒストンのアセチル化状態を若齢と同程度に低下させる効果があること、一方で細胞質の高い活性酸素が、高い異常受精の原因ではないことが明らかになった。また、レスベラトロールの加齢ウシ卵子の受精能改善効果を考えると、SIRT1 を介したミトコンドリアの更新の誘起が、老齢牛由来卵の発生能力を改善することにつながるのではないかと推測した。

審査報告概要

大動物の加齢に伴う卵子の変化は明らかにされておらず、その解明は卵子異常に対する対処法を考える上で重要である。本研究では、加齢と若齢ウシの卵子を比較し、網羅的な遺伝子解析と培養試験より受精能力とミトコンドリアに異常がある可能性を明らかにした。さらに卵子のミトコンドリアの DNA コピー数が加齢に伴い減少すること、DNA コピー数、受精率そして卵子の ATP の含有量の間の相関関係が加齢と若齢度異なることを示した。また、ミトコンドリア異常に起因する活性酸素は加齢個体の卵子に多く、これが加齢個体で卵子のヒストン

アセチル化亢進の原因となっていることを示した。また活性酸素の除去は加齢ウシ卵子の受精率の改善には寄与せず、ミトコンドリアの更新を促すレスベラトロールが受精能力の改善効果を持つことを示した。本研究ではヒトと同様の卵胞形成パターンをもつ大動物を用いて、加齢に伴う卵子の異常の原因に関する新規性のある知見を得た。

よって、審査員一同は博士（畜産学）の学位を授与する価値があると判断した。